

УДК 616.33/.342-002.44-005.1-08-092

© А.О. Тюпка, Н.М. Кононенко, Ю.Б. Лар'яновська, 2012.

ГАСТРОПРОТЕКТОРНА ДІЯ НАНОЕМУЛЬСІЇ ЛІПОСОМ З ПОЛІФЕНОЛАМИ ВІНОГРАДНОГО НАСІННЯ (ГІСТОМОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

А.О. Тюпка, Н.М. Кононенко, Ю.Б. Лар'яновська

Національний фармацевтичний університет, кафедра патологічної фізіології (зав. – професор Н.М. Кононенко), м. Харків.

GASTROPROTECTIVE EFFECT OF NANOEMULSION OF LIPOSOMES WITH POLYPHENOLS OF GRAPE SEEDS (HISTOMORPHOLOGICAL RESEARCH)

A.O. Tiupka, N.M. Kononenko, Yu.B. Laryanovskaya

SUMMARY

This research presents the results of morphological investigation of the gastric mucosa of rats with acute serotonin ulcer. Found out that the nanoemulsion liposomes with polyphenols of grape seeds shows a pronounced therapeutic effect, treats defects in the gastric mucosa and restores the state of the protective mucus barrier. For expression of the therapeutic effect of nanoemulsion of liposomes with polyphenols of grape seeds exceeds the reference drug altan.

ГАСТРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЭМУЛЬСИИ ЛИПОСОМ С ПОЛИФЕНОЛАМИ ВІНОГРАДНЫХ СЕМЯН (ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А.А. Тюпка, Н.Н. Кононенко, Ю.Б. Ларьяновская

РЕЗЮМЕ

В работе приведены результаты морфологического исследования слизистой оболочки желудка крыс с острой серотониновой язвой. Установлено, что наноземulsion липосом с полифенолами виноградных семян проявляет выраженное лечебное действие, заживляя дефекты слизистой оболочки желудка и восстанавливая состояние защитного слизистого барьера. По выраженности лечебного эффекта наноземulsion липосом с полифенолами виноградных семян превосходит препарат сравнения алтан.

Ключові слова: виразка шлунка, гастропротекторна дія, ліпосоми, виноградне насіння.

За даними ВООЗ, до 10-15% дорослого населення розвинутих країн протягом життя хворіють на виразкову хворобу [5]. За даними Центра медичної статистики України, захворюваність виразковою хворобою в нашій країні за останні 10 років збільшилася на 38,4%. Висока захворюваність, часті рецидиви, тривала непрацездатність хворих, переважно молодого віку, внаслідок цього значні економічні втрати - все це дозволяє віднести проблему виразкової хвороби до числа найбільш актуальних у сучасній медицині [2, 9].

Актуальність створення нових лікарських форм із застосуванням нанотехнологій представляється своєчасною задачею охорони здоров'я нашої країни, тому що розвиток нанофармакології і створення принципово нових ліпосомальних лікарських препаратів – це новий прогресивний шлях до успіхів у лікуванні хворих [1]. Це дозволить вирішити основну задачу охорони здоров'я – підвищити ефективність та знизити токсичність ліків у новій лікарській формі, що створена методами нанотехнологій [7, 10].

Поліфеноли виноградного насіння – це потужні антиоксиданти. За даними клінічних випробувань доведено, що антиоксидантні властивості олігомерів проціанідинів виноградного насіння в 20 разів сильніше вітаміну С і в 50 разів – вітаміну Е. Фенольні речовини виноградного насіння, включаючи

флавоноїди та поліфеноли, становлять інтерес через здатність поглинання вільних радикалів. Окрім антиоксидантного впливу, поліфеноли з виноградного насіння гальмують деякі ферменти, що каталізують викид у кров гістаміну, що обумовлює запалення та алергічні реакції, тобто мають протизапальні властивості [3].

Таким чином, фармакологічні властивості поліфенолів виноградного насіння, наявність достатньої сировинної бази на території України стали передумовою для створення на кафедрі біологічної хімії НФаУ під керівництвом професора А.Л. Загайко наноземulsion ліпосом з поліфенолами виноградного насіння (НЛПВН).

Метою нашого дослідження стало вивчення впливу НЛПВН на морфологічний стан слизової оболонки шлунка (СОШ) лабораторних тварин в умовах серотонінового ураження шлунка;

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

Гастропротекторну дію НЛПВН вивчали на моделі гострої серотонінової виразки. До початку моделювання ушкодження шлунка тварин протягом 12 годин витримували на голоді з вільним доступом до води. Після закінчення зазначеного часу серотонін вводили щурам внутрішньоочеревинно в дозі 30 мг/кг (0,6% розчин) три рази через добу. На шосту добу

одержували виражене ушкодження СОШ [12]. Лікування тварин починали з 7-го дня після першої ін'єкції серотоніну та продовжували протягом наступних 3-х днів. Виведення з експерименту всіх тварин проведено шляхом перерізки сонної артерії на 10 день досліду. Шлунок розтинали по великій кривизні. Для послаблення скорочення м'язів шлункової стінки резецирований шлунок розтягували на пінопластовій поверхні слизовою верх, закріплювали голками, накладали вату, змочену 10% розчином формаліну. Після 10-ти хвилинної попередньої фіксації шлунок цілком дофіксували протягом 24 годин у 10% розчині формаліну. При вирізці зразків строго дотримувалися топографічного принципу. При наявності на зразках виразки брали як саму виразку, так і її перифокальну зону. Зразки шлунка після фіксації зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, заливали у целоїдин-парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, становили ШПК-реакцію за Мак-Манусом для виявлення глікопротеїнів (нейтральних мукополісахаридів) [6, 8]. На препаратах проводили напівкількісну оцінку патологічних змін слизової (за основу взято напівкількісну візуальну оцінку потужності гістохімічних реакцій за методом Соколовського [11]) за такими показниками: 1 – *виразність деструктивних змін* (0 балів – пошкодження відсутні; 0,5 балів – поодинокі дрібні поверхневі ерозії – пошкодження тільки покривного епітелію з збереженням структури залоз та підлеглої строми; 1 бал – розповсюджені поверхневі ерозії без змін залозистих структур; 2 бали – одиничні дрібні виразки, глибина поразки залозистих трубок до S! їх довжини; 3 бали – численні дрібні виразки або одиничні середні за розміром виразки з глибиною поразки до S довжини залоз; 4 бали – численні середні або

одиничні великі виразки з поразкою T! та більше довжини залоз); 2 – *потужність гемакапілярних розладів поза зон деструкції* (0 балів – відсутність розладів; 1 бал – слабкі вогнищеві розлади; 2 бали – помірні дифузні розлади; 3 бали – виразні дифузні розлади); 3 – *набряк слизової поза зон деструкції* (0 балів – відсутність ознаки; 1 бал – слабкий вогнищевий; 2 бали – помірний вогнищевий; 3 бали – виразний вогнищевий або дифузний); 4 – *стан слизоутворюючих елементів шлунка* (покривний та ямковий епітелій) поза зон деструкції за виразністю ШПК-реакції (0 балів – фарбування відсутнє; 1 бал – слабе фарбування, 2 бали – помірне фарбування, 3 бали – виразне фарбування).

Аналіз мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400 (Австрія), мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4 GHz за допомогою програми Nikon View 5. Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи критерій Мана-Уїтні [4]. Для визначення статистичних розбіжностей використовували стандартний пакет програм "Statistica 6".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Макроскопічний огляд слизової залозистого відділу шлунка інтактної групи щурів показав нормальний рельєф складок, забарвлення притаманне здоровому шлунку. Поверхня слизової чиста. При мікроскопії видно, що слизова досліджених ділянок подана великою кількістю валиків, поверхня яких прикрита помірно високими циліндричними епітеліальними клітинами. Ядра містяться у базальній частині клітин, достатньо чітко розташовані в один ряд (рис. 1).

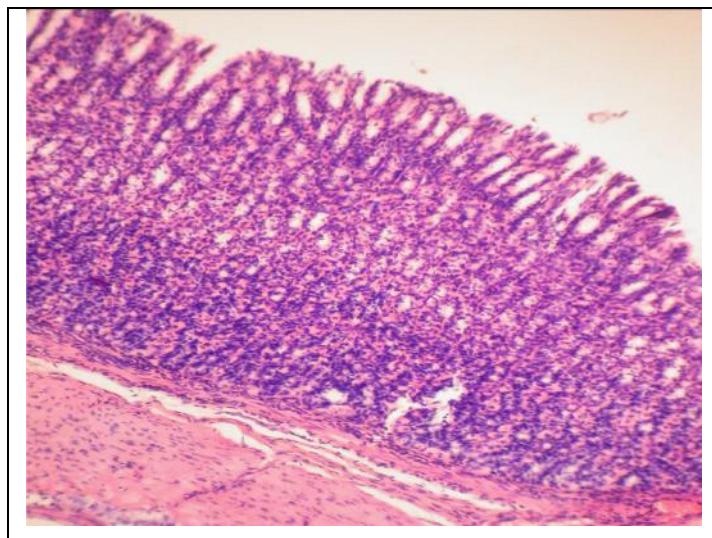


Рис. 1. Слизова шлунка інтактних щурів: нормальний стан залозистих трубок. Гематоксилін-еозин. 36. x 100.

Апікальні відділи цитоплазми багаті на ШПК-позитивний секрет – нейтральні МПС, що є основним захисним компонентом слизового бар'єру. Шлункові ямки доволі глибокі, у клітинах, що вистеляють ямки, виявлено потужне ШПК-позитивне фарбування. Власні залози (дно шлунка) щільно розташовані, довгі. Територіальне розміщення та взаємовідношення у них залозистих клітин звичайне. Додаткові (слизові) клітини розташовані у шийки залоз, вони також беруть участь у процесі слизоутворення. Потужність ШПК-реакції в них виразна. Парієтальні клітини оксифільні, за кількістю превалюють над іншими залозистими клітинами, розповсюджені у більшості на Т! тіла залоз. Головні клітини переважають у базальних відділах залоз. Цитоплазма їх містить білкові гранули, що фарбуються гематоксиліном. Секреторна зона клітин широка, просвіт залоз помірний. Інтермедіарні залози складаються з тих же самих клітинних елементів, що і головні залози, але відрізняються від них зовсім іншими кількісними співвідношеннями. В них міститься значно більше додаткових клітин (вони навіть частково заміщують головні клітини у базальному відділі трубок), головні клітини в певній мірі редуковані. Парієтальні клітини мають те ж саме, що у головних залозах, розміщення. Строма слизової помірно повнокровна,

містить варіюючи за кількістю лімфоцити та еозинофіли. М'язова пластинка слизової без особливостей. Підслизова оболонка незначна за товщиною, подана пухкою сполучною тканиною, в якій розташовані нормального вигляду кровоносні судини.

Після триразового внутрішньоочеревинного введення серотоніну у всіх тварин з групи контрольної патології макроскопічно відмічена нечіткість рельєфу складок слизової, певна набряклість її, а у 75% шурів виявлені різні за чисельністю та розміром геморагічні виразки в області дна та препілоричної зони слизової. Мікроскопічно видно, що більша частина виразок розповсюджувалася на всю товщу слизової. Залозисті структури, строма та навіть м'язова пластинка знаходилися у стані повної деструкції, мали місце масивні крововиливи, серед клітинного детриту іноді помітні відкладення різної кількості пігменту (іржавий відтінок). Решта дефектів була менш глибока, деструкція доходила до S глибини залозистих трубок. У збережених базальних відділах тіл таких залоз порушена чітка лінійність розташування, просвіт трубок часто розширено. Підслизовий шар під виразками виразно набряклий, кровоносні судини дилатовані, переповнені еритроцитами, нерідко спостерігали крововиливи (рис. 2).

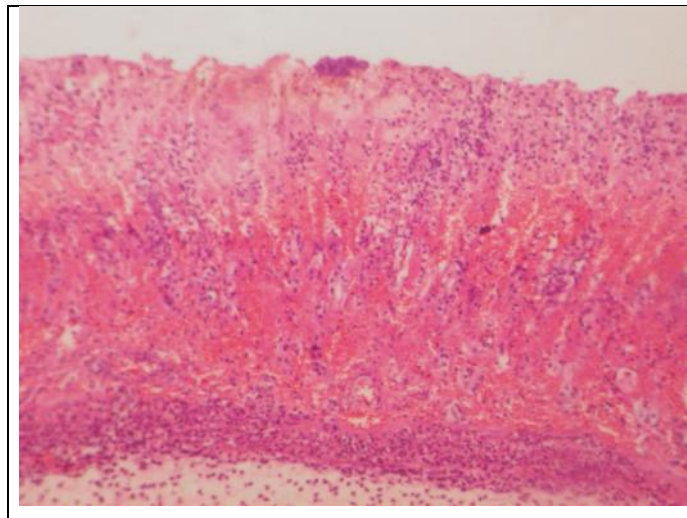


Рис. 2. Слизова шлунка щурів після введення серотоніну. Виразковий дефект з некрозом всіх шарів ділянки дна, масивні крововиливи. Гематоксилін-еозин. 36. x 100.

Поблизу кровоносних судин видні дрібні скупчення клітин (еозинофіли, лімфоцити, гістіоцити). На ділянках поза зон деструкцій спостерігали різні за виразністю розширення та повнокровність капілярної мережі, субепітеліальний набряк. Доволі часто простежені вогнищеві кругоклітинні інфільтрати у стромі. Місцями видні різні стадії утворення поверхневих ерозій – зниження висоти покривних епітеліальних клітин, дистрофія та злушення їх з оголенням строми. Підслизова залишалася виразно набряклою. Гістохімічне дослідження показало виразне зниження

інтенсивності ШПК-реакції у цитоплазмі клітин, що приймають участь у процесі слизоутворення. У цитоплазмі клітин покривного епітелію ШПК-позитивний матеріал займав лише крайові зони, вміст його був знижено і у ямковому епітелію.

Лікування НЛПВН сприяло виразному покращенню як макроскопічної, так і мікроскопічної картини СОШ щурів. Рельєф складок чіткий, слизова блідо-рожевого кольору, без видимих ознак набряку, геморагій, ерозивних пошкоджень. Структурна організація досліджених ділянок слизової у 50% щурів наближена до норми, покривні епітеліальні клітини

функціонально активні. Ще у 37,5% тварин спостерігали тільки дрібні вогнищеві поверхневі ерозії без зміни стану залозистих трубок (рис. 3 а, б). Місцями помічено зменшення висоти епітеліальних клітин. Субепітеліально іноді видно незначний вогнищевий набряк, повнокровність капілярів. І лише у одного щура (12,5% випадків) у глибині складки

виявлено дефект. Поверхня його епітелізована (проліферуючі клітини дрібні, не диференційовані), деструкції зазнали зони шийки залоз з підепітеліальною капілярною мережею. Більш глибокі ділянки залоз збережені, підслизовий шар набряклий (рис. 3 в).

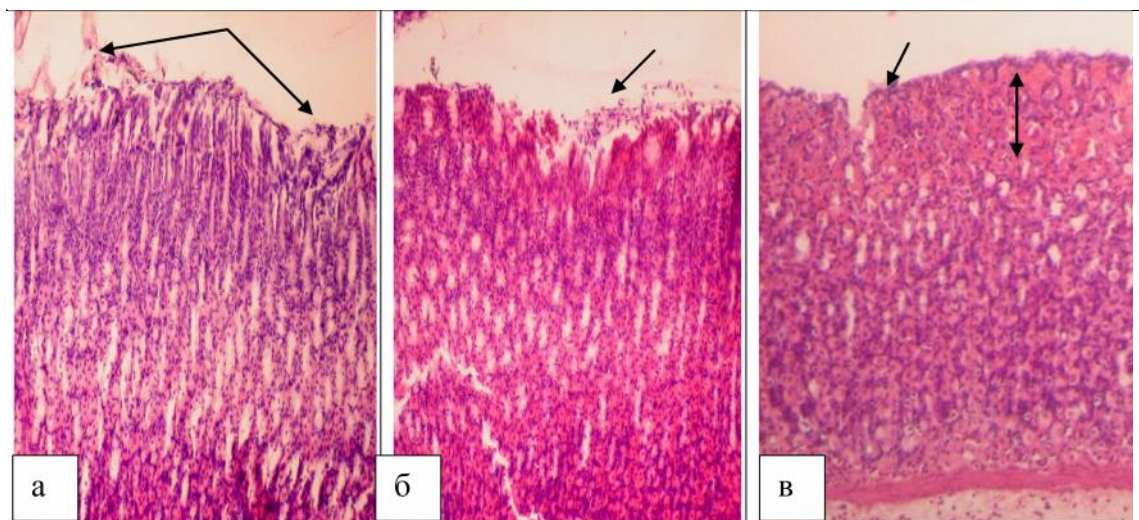


Рис. 3. Слизова шлунка щурів, яких лікували НЛПВН: поверхневі ерозії у ділянці дна (а) та препілоричній зоні (б) без зміни стану залозистих трубок; в – у епітелізованому дефекті видно деструкцію S! глибини залозистих трубок. Гематоксилін-еозин. 36.х100.

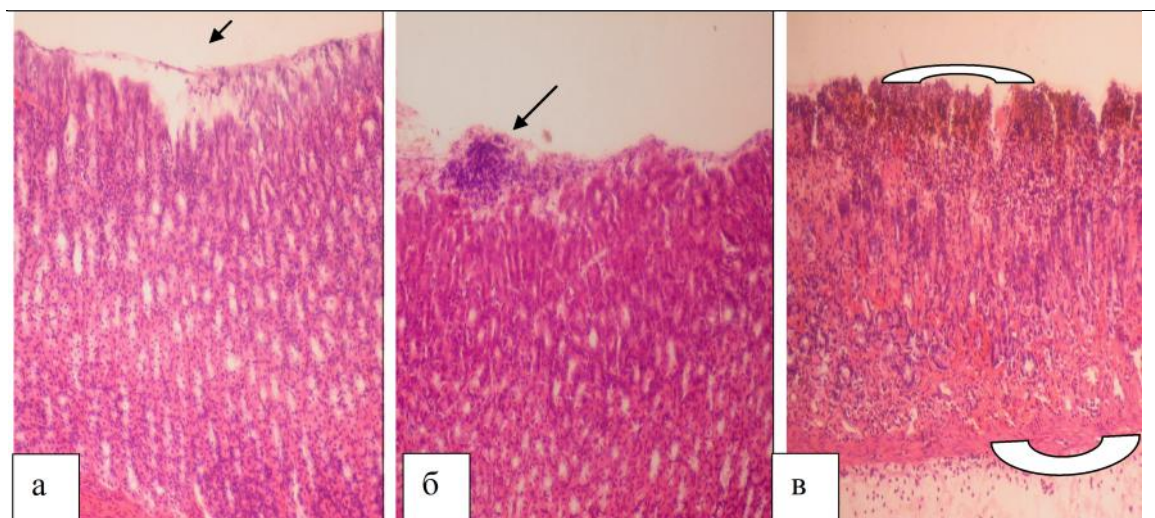


Рис. 4. Слизова шлунка щурів, яких лікували альтаном: а – поверхнева ерозія, б – некробіоз поверхневого епітелію та шлункових ямок; в – гостра виразка. Гематоксилін-еозин. 36.х100.

Гістохімічно у більшості тварин у покривно-ямковому епітелію порівняно з контрольною патологією значно підвищено вміст глікопротеїнів, часто виразність ШПК-реакції була на рівні інтактного контролю.

Після лікувального введення препарату порівняння альтану при макроскопічному огляді слизової шлунка спостерігали деяке сплюснення рельєфу складок, у частини щурів у ділянці дна видні

дрібні поодинокі точкові геморагічні ерозії. Мікроскопічне дослідження показало дуже варіюючу за станом картину. Так, у 37,5% щурів структурна організація СОШ повністю відновлена. У решти 62,5% тварин структурні зміни виразно коливалися: від наявності лише поверхневих ерозій до формування дрібних одиничних гострих виразок з поразкою більшості залозистих елементів (рис. 4 а, б, в).

Поза зон деструкцій місцями виявлено помірний

Виразність патологічних змін у слизовій шлунка щурів (бали)

Експериментальні групи	Показники			
	Деструкція слизової	Гемокапілярні розлади	Набряк	ШК-реакція
Інтактна група	0	0,5	0	2,75
Контроль (виразка без лікування)	2,87*	1,63*	2,0*	1,25*
Виразка + НЛПВН	0,44**/***	0,5**/***	0,25**/***	2,75**
Виразка + альтан	1,0*/**	1,0*/**	0,6*/**	2,5**

Примітки: * – відхилення статистично значущі відносно інтактної групи; ** – відхилення статистично значущі відносно контрольної групи; *** – відхилення статистично значущі відносно препарату порівняння альтану.

набряк та повнокровність капілярів підепітеліально, залишки круглоклітинної інфільтрації у стромі. Підслизовий шар під виразковими дефектами набряклий, у деяких тварин в ньому видні крововиливи. Вміст ШК-позитивного матеріалу у мукоїдному секреті покривно-ямкового епітелію поза зон деструкцій у частини щурів був на рівні інтактного контролю, але в ряді випадків інтенсивність фарбування була ще знижена.

Згідно з поставленими завданнями була проведена напівкількісна оцінка стану залозистої частини СОШ щурів (табл. 1).

Як видно з приведених у таблиці 1 даних НЛПВН виразно сприяє зменшенню деструктивних змін у досліджених ділянках залозистої частини СОШ щурів – в 6,5 рази порівняно з контрольною патологією. Гемокапілярні розлади знизилися у 3,3 рази. Практично зник набряк стромі слизової. Під впливом НЛПВН нормалізується процес слизоутворення (відновлено вміст нейтральних МПС у клітинах покривного та ямкового епітелію).

Препарат порівняння альтан також зменшує виразність деструкції, гемокапілярних розладів, набряку слизової, підвищує активність процесу секретотворення у покривно-ямковому епітелію відносно контрольної патології. Втім за виразністю лікувальної дії альтан поступається НЛПВН.

ВИСНОВКИ

1. НЛПВН проявляє виражені гастропротекторні властивості при експериментальній виразці шлунка: сприяє загоєнню дефектів слизової та відновлює стан захисного слизового бар'єру.

2. За виразністю лікувального ефекту НЛПВН перевищує препарат порівняння альтан.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аляутдин Р.Н. Нанотехнологии для направленной доставки лекарств / Р.Н. Аляутдин // 2010.— №4.— С. 61—63.
2. Аруин Л.И. Качество заживления гастродуоденальных язв: функциональная морфология, роль методов патогенетической терапии /Л.И. Аруин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2006. – №5. – С. 1-5.
3. Загайко А.Л., Вороніна Л.М., Стрельченко К.В. Полифенолы винограда культурного — эффективный засіб захисту від негативних наслідків стресу // Мед. хімія. - 2006. - Т. 8, №1. - С. 35-38.
4. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. – СПб.: ФОЛИАНТ, 2003. – 429 с.
5. Маев И.В. Язвенная болезнь / И.В. Маев, Самсонов А.А. // М.: МИКЛОШ, 2009. – 431 с.
6. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники.- М.: Медицина, Ленингр. Отд-ние, 1969.- 424 с.
7. Пальцев М.А. Нанотехнологии в клинической медицине и фармации / М.А.Пальцев // Новые медицинские технологии. 2009. – № 4. –С.4-9.
8. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная /Пер. С англ. – М.: Изд-во иностран. лит. – 1962. – 962с.
9. Скворцов В.В. Актуальные вопросы фармакотерапии язвенной болезни / В.В. Скворцов, А.В. Тумаренко, Е.М. Скворцова и др. // Поликлиника. 2011.- № 5.- С.122-124.
10. Сейфулла Р.Д. Фармакология липосомальных препаратов // Москва: 2010. – 241 с.
11. Соколовский В. В. Гистохимические исследования в токсикологии. Л.: Медицина, 1971. – 176с.
12. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / О.В. Стефанов // Київ.: Авіцена. – 2001. – 527 с.